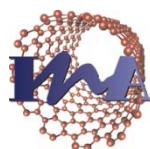




Universidad
Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón
Universidad Zaragoza

Simulación de membranas biológicas y su interacción con nanopartículas magnéticas.

Trabajo de Fin de Grado de Química

Curso 2018-2019

Paula de Dios Andrés

Directora: Pilar Cea Mingueza

Departamento de Química Física

Contenido

1.	Objetivos y planteamiento del trabajo.....	1
2.	Introducción	2
3.	Parte experimental. Materiales y métodos.....	5
a.	Disolventes y reactivos	5
b.	Substratos.....	5
c.	Nanopartículas.....	5
d.	Procedimiento experimental.....	6
i.	Técnica Langmuir-Blodgett.....	6
ii.	Microscopia de Fuerza Atómica	7
4.	Resultados y discusión.....	8
-	4.1. Isotermas de presión superficial vs. área por molécula.....	9
-	4.2. Ratio de transferencia	11
-	4.3. Caracterización de las películas.....	11
-	4.4. Caracterización de nanopartículas	20
5.	Conclusiones y trabajo futuro	22
6.	Bibliografía.....	24

Resumen

En la actualidad, la nanociencia es un campo de investigación a través del cual se pueden buscar alternativas para las numerosas incógnitas que se siguen teniendo en diversos campos como la medicina o la salud. En relación con esta rama de la ciencia, se encuentra la simulación de partes funcionales e imprescindibles de los seres vivos que permitan una mejor comprensión de su funcionamiento. En este trabajo de Fin de Grado se persigue la modelización y optimización de membranas celulares simplificadas usando tres componentes elementales (un fosfolípido, colesterol y un glicosfingolípido) para, posteriormente depositar nanopartículas magnéticas y observar su interacción con dicha membrana. Para ello, se construyen monocapas de los tres componentes mediante la técnica de Langmuir-Blodgett y se caracterizan mediante microscopia de fuerza atómica (AFM). Por último se depositan nanopartículas de óxido de hierro y se estudia como interaccionan mediante AFM.

Nowadays, nanoscience is a field of research where alternatives for undiscovered issues in several fields such as medicine or health can be found. Related with this discipline, simulation of functional and essential parts of living beings is used to understand their functioning. In this final year project, the modeling and optimization of simplified cell membranes is pursued using three elemental components (a phospholipid, cholesterol and a glycosphingolipid). Then, we deposit magnetic nanoparticles and observe their interaction with the model cell membrane. To do so, monolayers of the three components are fabricated using the Langmuir-Blodgett technique and they are subsequently characterized by atomic force microscopy (AFM). Finally, iron oxide nanoparticles are deposited and their interaction with the model cell membrane is studied by AFM.

1. Objetivos y planteamiento del trabajo

El Trabajo de fin de Grado (TFG) se corresponde con una asignatura obligatoria de 9 créditos del título del Grado de Química de la Universidad de Zaragoza. Este trabajo persigue la introducción a la investigación de los estudiantes de Química y la aplicación de los conocimientos adquiridos hasta la fecha. Mediante esta asignatura el estudiante se integra en un grupo de investigación, tomando conciencia del método científico y aprendiendo a organizar su trabajo en el laboratorio de forma rigurosa, desarrollando aptitudes para buscar soluciones a las diferentes incógnitas y problemas que se presentan a lo largo de la investigación, así como a resolverlas de manera autónoma. Además, el estudiante tiene la oportunidad de conocer nuevas técnicas y equipos que posibilitan ampliar sus conocimientos de forma práctica.

Este TFG tiene como objetivo el aprendizaje de nuevas metodologías para la simulación de membranas celulares y la posterior deposición de nanopartículas magnéticas sobre dichas membranas. En particular, se persigue la meta de obtener modelos de membranas celulares simplificados, usando tres componentes primarios de la misma, colesterol, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y un glicosfingolípido sintético (GSL) mediante la técnica de Langmuir-Blodgett (LB). Estas monocapas se caracterizarán mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) para, posteriormente, depositar nanopartículas de óxido de hierro sobre los modelos de membrana celular analizando su distribución en la membrana y dejando abierto el camino a los estudios de hipertermia magnética donde se aplicaría un campo magnético alterno al objeto de crear puntos calientes que modifiquen las propiedades de la membrana como la fluidez o la permeabilidad, lo que podría facilitar la introducción de ciertas sustancias de interés en la célula, como medicamentos.

Por tanto, los objetivos científicos específicos incluyen: (i) fabricar modelos de membrana; (ii) lograr depositar nanopartículas magnéticas sobre membranas simuladas y (iii) caracterizar mediante microscopía de fuerza atómica los sistemas generados.

2. Introducción

Este trabajo titulado “Simulación de membranas biológicas y su interacción con nanopartículas magnéticas” ha sido realizado en el contexto de la asignatura de Trabajo de Fin de Grado de cuarto curso del grado de Química. Buena parte del trabajo se ha desarrollado en el Instituto de investigación Universitario de Nanociencia de Aragón (INA).

La nanotecnología y la nanociencia hacen referencia a todo aquello que se encuentra en la nanoescala. Su objetivo es entender y controlar los procesos que se llevan a cabo a nivel molecular en los organismos, ya que las moléculas básicas como el agua y las biomoléculas son la base del funcionamiento de los organismos. El desarrollo de materiales en la nanoescala y el control de sus propiedades abren un campo de trabajo que puede ir desde aplicaciones médicas hasta tecnológicas.¹

El concepto de nanómetro fue introducido por Richard Zsigmondy para caracterizar el tamaño de partículas coloidales de oro, siendo pionero en observaciones y medidas en esta escala gracias al desarrollo del ultramicroscopio, motivo en parte por el que recibió el premio Nobel en 1925. Más adelante Richard Feynman, comenzaría a hablar de la manipulación de la materia a nivel atómico (1956) y 15 años más tarde el japonés Norio Taniguchi usaría el concepto de nanotecnología para describir los comportamientos de los semiconductores.²

Uno de los campos en los que la nanociencia ha revolucionado la forma de trabajar es el de la salud, englobando aquí a disciplinas como la medicina, la química y la biotecnología. Los seres vivos estamos compuestos por moléculas y la posibilidad de usar métodos y materiales que se encuentren en la escala de las moléculas supone un gran avance que se traduce, entre otras aplicaciones, en la lucha contra el cáncer, tanto a un nivel de diagnóstico como de nuevos tratamientos.³

La unidad básica de la vida es la célula así que su estudio y conocimiento es vital. Las células animales tienen una membrana celular con gran diversidad de compuestos como proteínas y lípidos y una fluidez única, así como una composición no homogénea que hace que trabajar con ella y llegar a entender su comportamiento a nivel molecular sea

un trabajo complejo. La membrana celular puede explicarse como un modelo de mosaico fluido donde las moléculas tienen una naturaleza anfipática, es decir, los grupos polares se orientan hacia la fase acuosa y los grupos no polares de naturaleza hidrofóbica se orientan hacia el interior de la matriz. Los fosfolípidos se organizan de manera discontinua formando una bicapa fluida en la que también hay lípidos que son los encargados de interaccionar con las proteínas.⁴ Se estima que, aproximadamente el colesterol representa el 30% de los lípidos de la membrana celular,⁵ si bien este porcentaje varía en distintos tipos de células y aumenta en células tumorales.

Se pueden modelizar las membranas celulares mediante gran variedad de técnicas.⁶ Un método teórico es la simulación en computadores por dinámica molecular (MD) en el que una molécula de 3 átomos de carbono o una de agua simulan las moléculas que se desean estudiar, haciendo coincidir la solubilidad y la compresibilidad de estos componentes líquidos de forma que se reproducen los términos termodinámicos aunque se sacrifican algunos detalles atómicos o la viscosidad consiguiéndose mayores áreas de bicapas de lípido puro.⁷ Otro método, ya de naturaleza experimental, es la de fabricación de modelos de membranas celulares mediante vesículas que se adsorben, rompen e inmovilizan en superficies en forma de bicapas y que pueden ser usadas como reactores.⁸ Otro método de importante calado en la modelización experimental de membranas celulares es la técnica de Langmuir-Blodgett (LB),⁹ que permite la fabricación de mono o bicapas de forma ordenada de compuestos puros o sus mezclas. Las membranas pueden estudiarse en la interfase aire-agua, pudiéndose introducir diferentes materiales en la subfase para analizar su interacción con la membrana, o bien, pueden ser transferidas sobre un soporte sólido para estudiar sobre éste sus características (morfología, topografía, separación de fases entre sus componentes, etc.) así como la naturaleza de las interacciones de esta membrana modelada con medicamentos, nanopartículas, etc.

Este TFG busca sentar las bases para una modelización simple de la membrana celular para llegar a entender su comportamiento al depositarse sobre la misma nanopartículas magnéticas. En trabajos ulteriores se aplicará un campo magnético alterno (AMF), con la finalidad de ser capaces de modificar las propiedades de la membrana al objeto de obtener poros en la membrana que permitan la entrada y salida de fármacos. Este

trabajo se enmarca en el proyecto europeo MagicCellGene.¹⁰ En concreto, en este TFG pretendemos entender el comportamiento de sistemas simulados que contengan tres componentes habituales en la membrana celular y aprender algo más sobre las interacciones entre ellos y los diferentes tipos de arquitecturas bidimensionales que forman. Para ello se ha trabajado con tres tipos de materiales presentes en las membranas celulares: colesterol (Col), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y un glicosfingolípido (GSL), que han sido depositados sobre mica, sustrato hidrofílico muy plano, que permite caracterizar correctamente las películas formadas mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Sus estructuras químicas se muestran en la Figura 1.

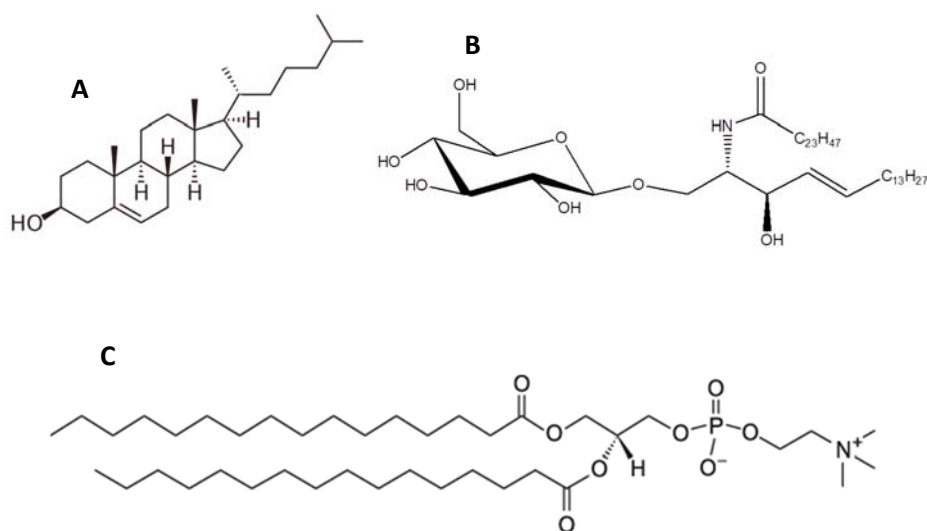


Figura 1. Estructuras del: A) Colesterol. B) Glicosfingolípido sintético. C) DPPC

Previo a este TFG el grupo de investigación en cuyo marco se ha realizado este trabajo consiguió obtener monocapas de DPPC:Col en ratio 1:1 de gran homogeneidad y se ha descubierto que estas monocapas, en agua, se reorientan formando bicapas bien organizadas y dejando huecos libres en la mica.¹¹ Por este motivo (homogeneidad en las películas con un ratio DPPC:Col 1:1), en este trabajo se ha mantenido esa proporción entre estos componentes, al que se han añadido cantidades variables del GLS.

3. Parte experimental. Materiales y métodos.

a. Disolventes y reactivos

En la Tabla 1 se indican los reactivos empleados en este trabajo, indicándose el CAS; la pureza y la casa comercial en la que fueron adquiridos.

Tabla 1. Disolventes y reactivos utilizados en el TFG.

Compuesto	Nº Cas	Pureza	Proveedor
DPPC	63-89-8	≥99%	Sigma- Aldrich
Colesterol	57-88-5	≥99%	Sigma- Aldrich
Glicosfingolípido	-		Sintetizado por el Dr. Daniel B. Werz de la Technische Universität Braunschweig (Alemania)
Cloroformo	67-66-3	≥99%	Macron Fine Chemicals
Agua Milli-Q	7732-18-5	18,2 MΩ·cm (resistividad)	Destilador INA
Etanol	64-17-5	≥99%	Macron Fine Chemicals
Acetona	200-662-2	≥99%	Macron Fine Chemicals

b. Substratos

Las monocapas han sido depositadas en substratos de mica proporcionados por Electron Microscopy Sciences Company (Cat. #71851-05, tamaño de lámina 1" x 3"; 25 x 75 mm y espesor 0.26-0.31 mm). Se han cortado con tijeras a tamaños 1x1 cm² y se han exfoliado con celo inmediatamente antes de su uso.

c. Nanopartículas

Las nanopartículas usadas en este trabajo han sido sintetizadas por el grupo de investigación BIONANOSURF, cuyo director es el profesor Jesús Martínez de la Fuente. Se trata de nanopartículas EMA-T1-21 de 12.7 +/- 1.7 nm (el núcleo inorgánico), y están cubiertas con PMAO-TAMRA (1%).

La funcionalización de las nanopartículas se ha llevado a cabo a través de un polímero anfifílico que permite la estabilización de estas en un medio acuoso. De esta manera la cubierta del polímero sirve de plataforma para incorporar biomoléculas.¹²

Las nanopartículas de óxido de hierro se obtienen al calentar a alta temperatura una solución de acetilacetato de hierro (III) ($\text{Fe}(\text{acac})_3$), con 1,2- hexadecanodiol en presencia de ácido oleico y oleamina, dando lugar a nanopartículas dispersas de magnetita (Fe_3O_4).¹³

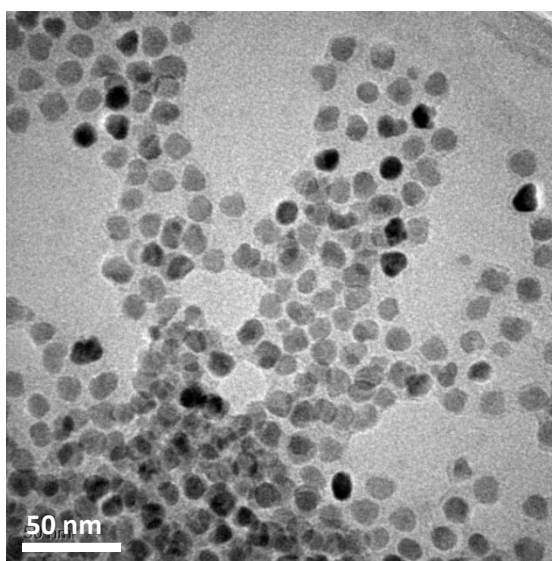


Figura 2. Imagen del microscopio electrónico de transmisión (TEM) de las nanopartículas usadas

d. Procedimiento experimental

A continuación, se describen las técnicas usadas para la formación y caracterización de las monocapas.

i. Técnica Langmuir-Blodgett

Se ha utilizado una cuba KSV-NIMA que se encuentra cerrada, en una sala limpia, a temperatura controlada ($20 \pm 1^\circ\text{C}$). La presión superficial se determina con una balanza de Wilhelmy empleando un papel de filtro que se renueva en cada experimento.¹⁴

La cuba se limpia, en primer lugar, pasando papel de laboratorio impregnado de acetona, se dejan pasar 15 minutos para que se evapore completamente, y a continuación se realiza el mismo paso con cloroformo, dejando secar 15 minutos para

hacer más hidrofóbico al teflón. Una vez se tiene la cuba limpia, se realizan tres lavados con agua Milli-Q. Se enrasa la cuba con agua Milli-Q, se dispersa la correspondiente disolución con una jeringuilla Hamilton gota a gota, con mucho cuidado para que la presión superficial se mantenga en $0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Una vez se haya dispersado el volumen correspondiente, se permite la evaporación del disolvente durante 15 minutos y después se comienza la compresión con las barreras de teflón, a una velocidad de $6 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$. En primer lugar, se determina la concentración con la que se va a trabajar, para lo que se registran tres isothermas y nos aseguramos de su reproducibilidad (la presencia de agregados hace que las isothermas no sean reproducibles y conllevaría un cambio en las condiciones de trabajo). Para ello, se comprimen las moléculas hasta colapso, en este caso hasta presiones superficiales del orden de $50\text{-}60 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Posteriormente se realizan las transferencias correspondientes mediante la técnica Langmuir-Blodgett, es decir, la aproximación de la mica es perpendicular a la superficie del agua.¹⁵ Para ello, en primer lugar se exfolia la mica y se sumerge en el agua Milli-Q de la cuba sin haber dispersado. Una vez sumergida, se dispersa la mezcla y se cierran las barreras hasta la presión de transferencia ($\pi=35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$). Tras pasar 100 segundos desde que se ha alcanzado dicha presión, se eleva la mica que se encuentra conectada a un brazo móvil vertical. Para las transferencias de una película del GSL sobre mica, se ha usado la técnica Langmuir-Schaefer (LS),¹⁶ donde la transferencia se realiza en horizontal (la superficie del sustrato se aproxima de forma paralela a la superficie del agua), sosteniendo la mica mediante una ventosa y a la que se hace tocar la superficie del agua una vez se haya alcanzado la presión de transferencia para levantarla después permitiendo así la deposición de una monocapa.¹⁷

ii. Microscopia de Fuerza Atómica

El microscopio de fuerza atómica¹⁸ ha permitido caracterizar las muestras preparadas por la técnica anteriormente descrita. Este microscopio cuenta con una punta que interactúa con la muestra por fuerzas de atracción y repulsión y permite obtener una imagen de la superficie de la muestra. El AFM cuenta con una palanca (*cantilever*) en cuyo extremo se encuentra una punta muy fina. Según las fuerzas entre la punta y la superficie, la palanca se sentirá atraída o repelida. Estos movimientos se registran con

ayuda de un láser sobre la punta de la palanca que es proyectado a un diodo fotoeléctrico que mide el voltaje y lo correlaciona con la variación de alturas en la morfología. Todas las caracterizaciones han sido realizadas en modo *tapping*, en el cual el cantiléver oscila tocando puntualmente la muestra.¹⁹

Se ha usado un microscopio Multimode 8 (Bruker) perteneciente al laboratorio de microscopías avanzadas (LMA) de la Universidad de Zaragoza. Las puntas usadas para medir en aire fueron RTESPA-150 (150 kHz (nominal), $k = 6 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ (nominal) de la casa comercial Bruker). Para las medidas realizadas en líquido (agua Milli-Q) se usaron puntas Scanasyt-Fluid+ (130 kHz (nominal aire), $k = 0,5 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ (nominal) de Bruker). Las imágenes fueron tomadas en rango de escaneos de 1 Hz y un *set point free amplitude* de ratio de 0,9. Antes de medir en líquido, siempre se ha esperado 30 minutos para permitir que el sistema muestra-agua-punta alcance el equilibrio térmico.

Todas las imágenes, los perfiles de altura y los análisis de recubrimiento superficial fueron analizados con el software Gwyddion (www.gwyddion.net).

4. Resultados y discusión

En este apartado se presenta la fabricación de las monocapas estudiadas así como su caracterización mediante AFM de las películas transferidas sobre un soporte sólido, interpretando los resultados obtenidos. En la Tabla 2 se muestran las composiciones estudiadas en este trabajo o en estudios previos (a efectos comparativos), indicándose la publicación donde éstas fueron analizadas.

Tabla 2. Descripción de las películas estudiadas en este trabajo, donde se indica la ratio de los tres componentes, el volumen dispersado de muestra sobre la superficie del agua y la presión de transferencia. En todos los casos se dispersaron 750 μL y la concentración de la disolución dispersada fue de 10^{-4} M.

Composición	Ratio	Presión de Transferencia
DPPC: Col: GSL ²⁰	0:1:0	35
DPPC: Col: GSL ²⁰	1:0:0	35
DPPC: Col: GSL ²⁰	1:1:0	35
DPPC: Col: GSL	1:1:0,22	35
DPPC: Col: GSL	1:1:0,50	35
DPPC: Col: GSL	1:1:0,86	35
DPPC: Col: GSL	1:1:1	35
GSL	0:0:1	8

Todas las disoluciones de partida utilizadas en este trabajo tienen una concentración 10^{-4} M. Las transferencias de las monocapas de Langmuir de los tres componentes se realizaron con el substrato inmerso en la fase acuosa mediante LB, de forma que la parte polar de los componentes se adhiere a la mica y los hidrofóbicos quedan expuestos al ambiente. Las transferencias que solo implican al glicosfingolípido se realizaron por la técnica LS debido a que resultó en una mejor transferencia.

- 4.1. Isotermas de presión superficial vs. área por molécula

En la Figura 3, se muestran isotermas presión superficial vs. área por molécula (π -A) representativas de las mezclas DPPC:Col:GSL estudiadas. Todas ellas se han registrado un mínimo de tres veces para comprobar su reproducibilidad, entendiendo por isoterma reproducible todas aquellas que no presenten variaciones de área por molécula inferiores al 5% entre sí a una determinada presión superficial.

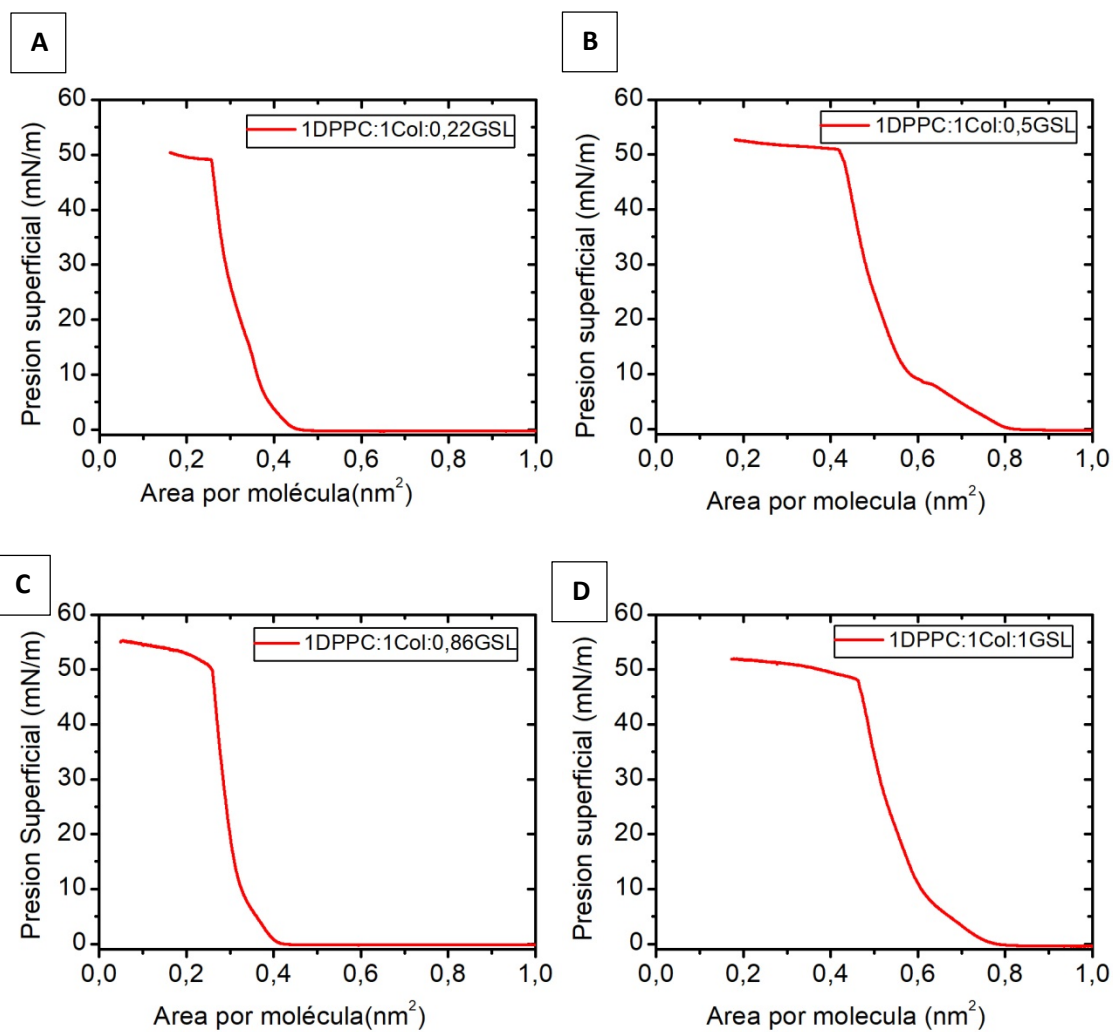


Figura 3. Isotermas presión superficial vs. área por molécula (π -A) del sistema DPPC:Col:GSL para las composiciones indicadas.

En la Figura 4 se muestra la isoterma reproducible del glicosfingolípido.

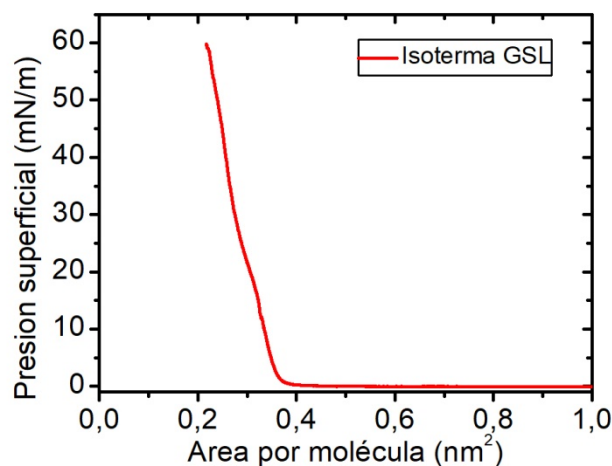


Figura 4. Isoterma presión superficial-área por molécula del GSL.

- 4.2. Ratio de transferencia

Al transferir una monocapa sobre un sustrato de superficie geométrica S_0 , la superficie ocupada por la monocapa en la interfase aire-agua se reduce en un valor S_f . La relación entre estos valores se conoce como ratio de transferencia y viene dada por la ecuación:²¹

$$\alpha = \frac{S_f}{S_0} \quad (1)$$

La ratio de transferencia varía entre 0 y 1, siendo 1 el mejor valor posible para una transferencia. Las ratios de transferencia de todas las mezclas realizadas en este trabajo han sido determinadas por el software de la cuba KSV-NIMA y fueron en todos los casos de 1.

- 4.3. Caracterización de las películas

Todas las monocapas de Langmuir de DPPC:Col:GSL han sido transferidas a $\pi=35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para obtener las correspondientes películas de Langmuir-Blodgett, excepto la de GLS que se transfirió a $8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y se depositó mediante Langmuir-Schaefer. Estas presiones de transferencia fueron optimizadas para las mezclas DPPC:Col o para GSL por compañeros del grupo de investigación antes de que yo entrase a realizar el TFG.²⁰ Todas las muestras han sido caracterizadas mediante AFM determinando la raíz

cuadrática media (RMS) de la rugosidad, registrando perfiles de alturas y estableciendo las alturas de los dominios internos de cada zona cubierta. También se han realizado rascados con la punta del AFM para determinar la presencia de material en zonas de dudoso recubrimiento.

En primer lugar, la composición de menor ratio de GLS, 1:1:0,22 muestra regiones con ciertos dominios internos como puede observarse en las Figuras 5A y 5B. Además, el raspado manifiesta que el fondo no es mica desnuda, sino que hay algo de material depositado sobre él (Figuras 5C y 5D).

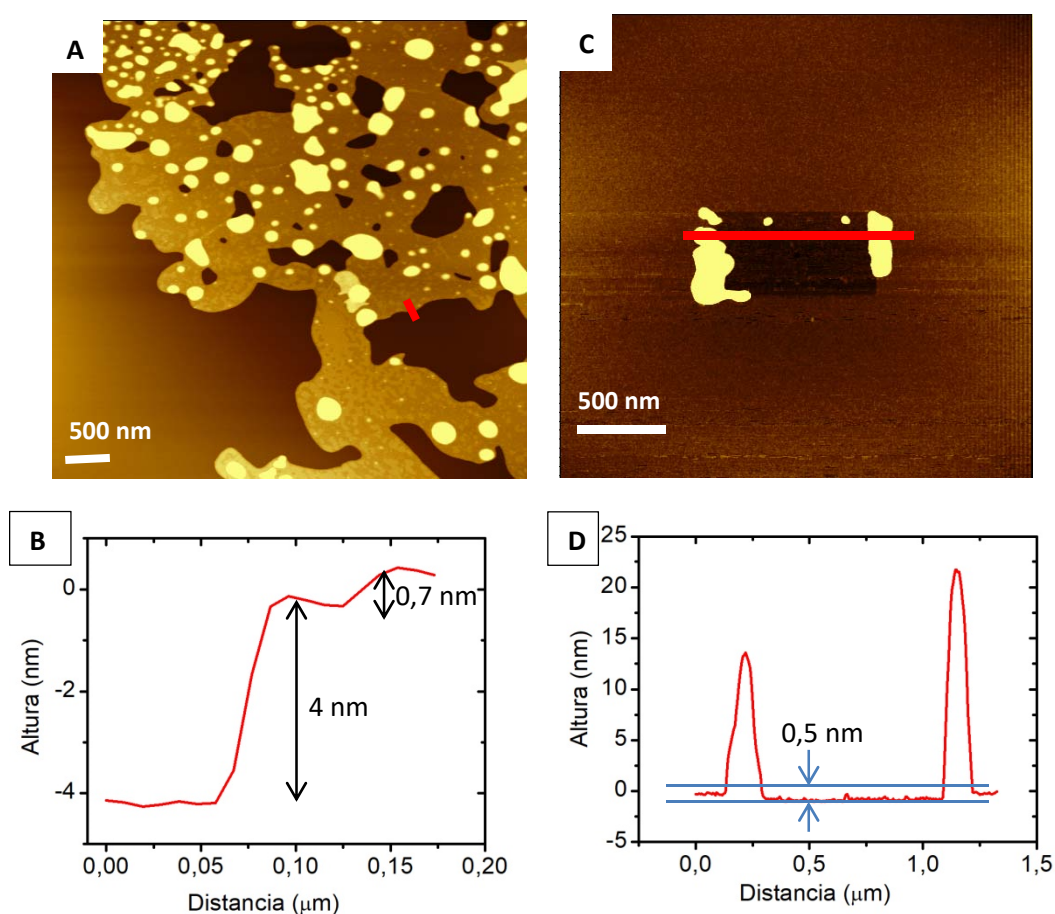


Figura 5. A) Imagen correspondiente a una película de composición 1:1:0,22 en la que se pueden observar regiones cubiertas con dominios internos. B) Perfil de alturas de la imagen A donde se observa que las regiones cubiertas por la película tienen una altura de ~ 4 nm y los dominios internos tienen alturas de $\sim 0,7$ nm. C) Imagen de una zona donde se ha raspado la muestra con la punta del AFM correspondiente a una mezcla de composición 1:1:0,22 realizada sobre una región de mica. D) Perfil de alturas de la imagen B donde se observa una película de $\sim 0,5$ nm de altura.

Para la composición 1:1:0,5, como muestra la Figura 6, también se observan regiones de película con dominios internos.

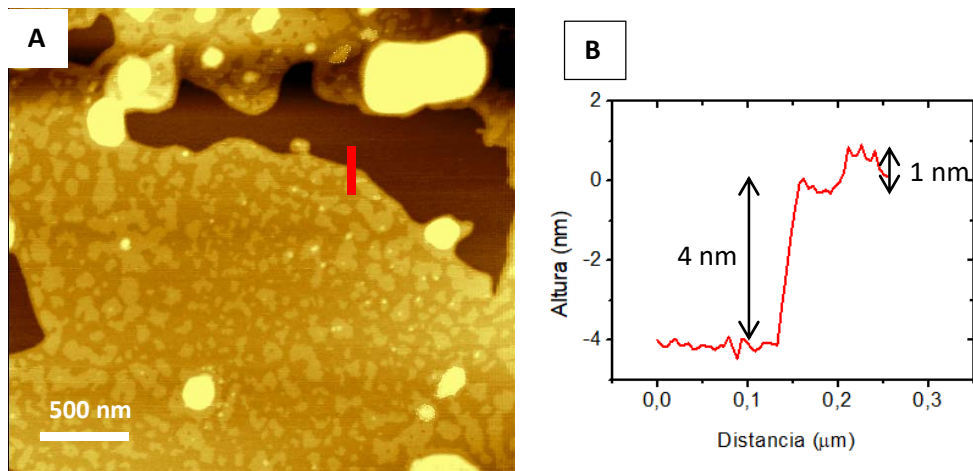


Figura 6. A) Imagen típica para la composición 1:1:0,5 en la que se pueden observar dominios con dominios internos. B) Perfil de alturas donde se puede observar que la altura de la región cubierta es de 4 nm y la de los dominios internos de 1 nm.

Para la composición 1:1:0,86, tal y como muestra la Figura 7, vuelven a verse dominios internos y el rascado nos vuelve a confirmar que el fondo no es solo mica sino que tiene material depositado sobre ella.

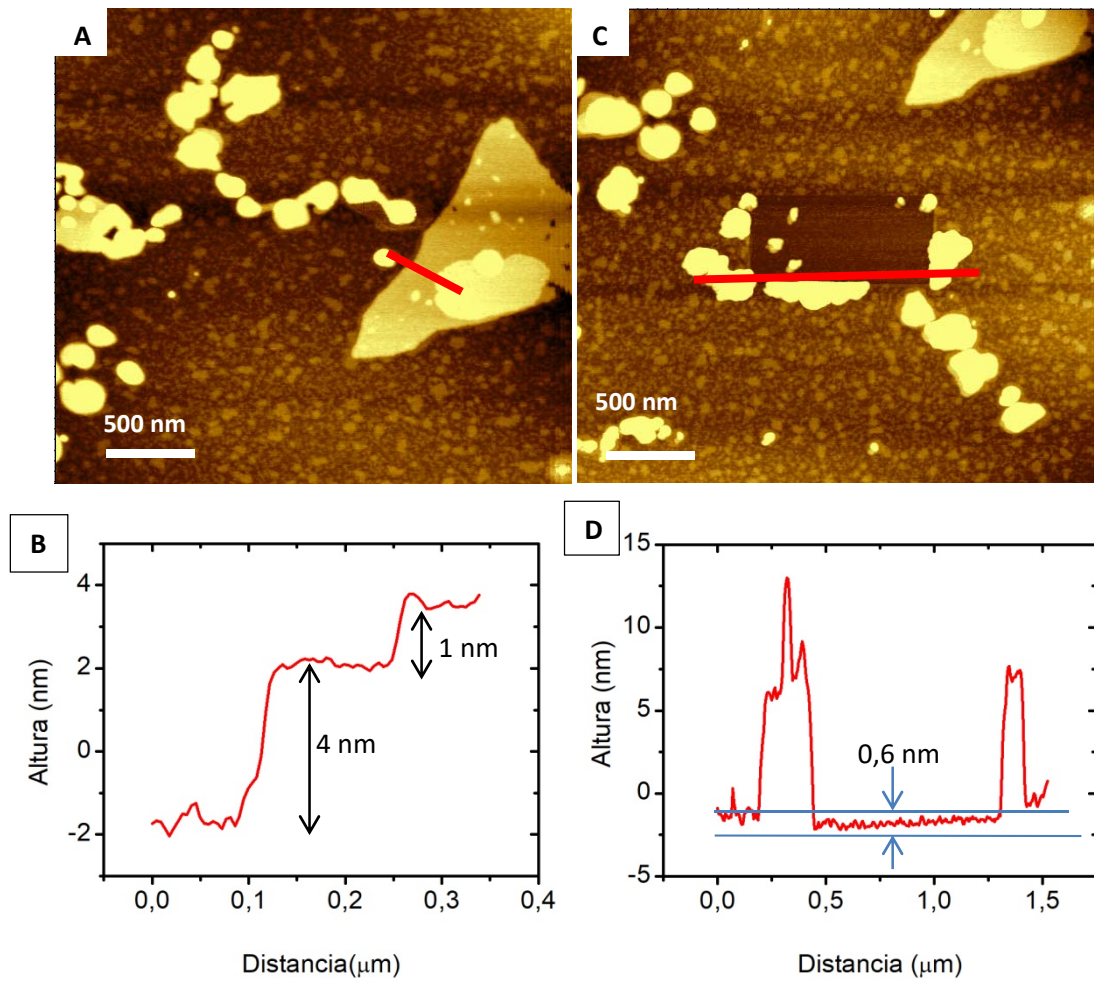


Figura 7. A) Imagen muestra una película LB de composición 1:1:0,86 en la que se pueden apreciar dominios internos. B) Perfil de alturas donde se observan alturas del orden de 4 nm para las regiones cubiertas y 1 nm de altura de los dominios internos. C) Rascado en una zona homogénea en el fondo de la película. D) Perfil de altura del rascado de C observándose la presencia de una película de 0,6 nm.

Tal y como muestra la Figura 8, correspondiente a la composición 1:1:1 también podemos encontrar dominios internos en las zonas cubiertas al igual que en las anteriores muestras y nuevamente el rascado muestra que el fondo no es mica, sino que hay material depositado sobre ella.

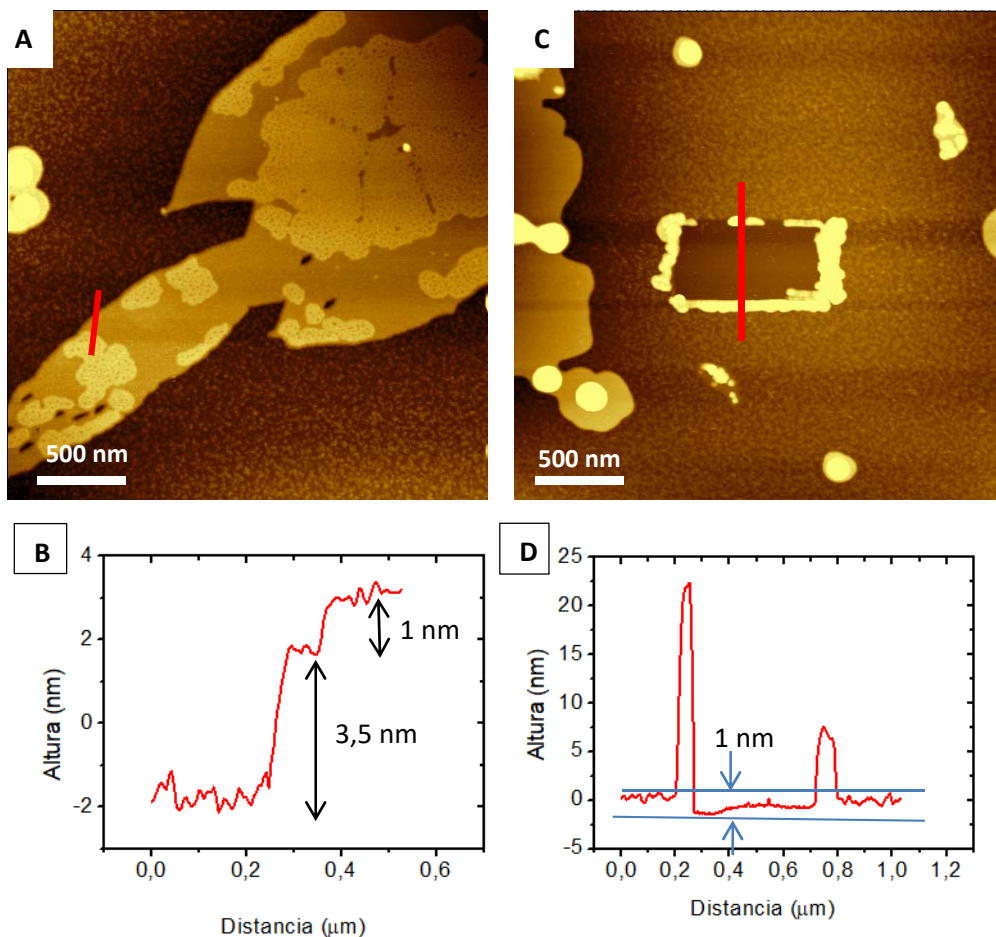


Figura 8. A) Imagen de una película de composición 1:1:1 donde se observan dominios internos dentro de cada región de película. B) Perfil de alturas de A observándose regiones con alturas de 3,5 nm y dominios internos de 1 nm de espesor. C) Imagen de un rascado para la composición 1:1:1 realizada sobre la región aparentemente no cubierta. D) Perfil de alturas de la zona rascada observándose una película de 1 nm de profundidad.

Para finalizar, también se estudió la película de GSL sin DPPC ni Col a efectos comparativos. Ésta fue transferida a $\pi = 8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ mediante la técnica LS. Tal y como muestra la Figura 9, el rascado de la región aparentemente desnuda también indica que hay material en el fondo aunque la profundidad de éste es mayor que las películas DPPC:Col:GSL descritas anteriormente. Además, también encontramos dominios internos que presentan mayores alturas que los de las películas DPPC:Col:GSL.

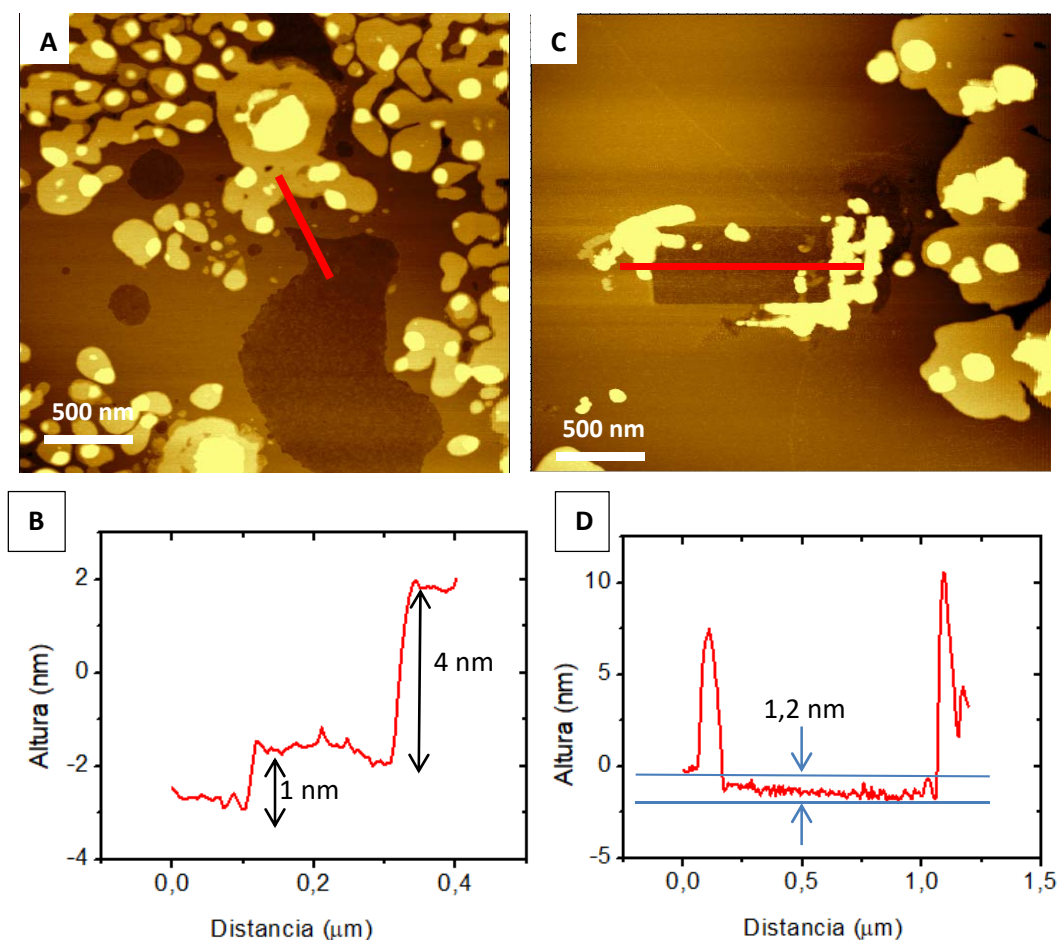


Figura 9. A) Imagen de una película de GSL. B) Perfil de alturas de los dominios con valores de 0,97 nm y 4 nm. C) Imagen de una zona rascada con la punta del AFM. D) Perfil de altura para zona aparentemente desnuda donde se observa una profundidad de 1,2 nm.

Para estudiar con más detalle esas zonas aparentemente desnudas, pero que hemos comprobado que contienen material, se estudiaron las muestras también en medio acuoso, analizando así posibles reorganizaciones los componentes. En la figura 10, se muestra una imagen AFM de una película de 1:1:0,22 en agua Milli-Q, donde se comprueba que las alturas de los dominios internos y de la región del fondo han variado con respecto al aire, indicando que la película sufre una reorganización cuando se encuentra en medio acuoso.

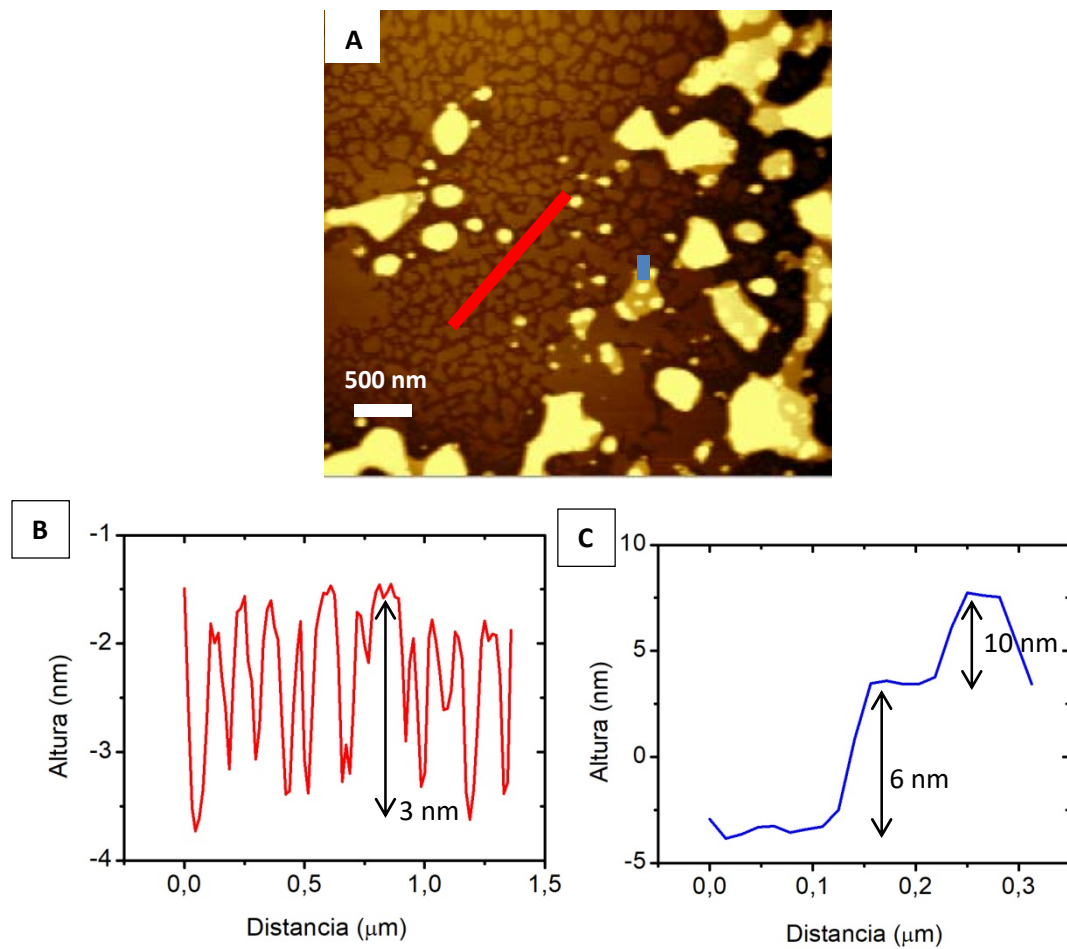


Figura 10. A) Imagen AFM correspondiente a una película 1:1:0,22 en agua. B) Perfil de altura del fondo con espesores de 3 nm y C) Perfil de alturas de los dominios internos con alturas entre 6 y 10 nm.

La Figura 11, a modo de resumen, presenta una comparativa de imágenes AFM de las cuatro mezclas DPPC:Col:GSL estudiadas

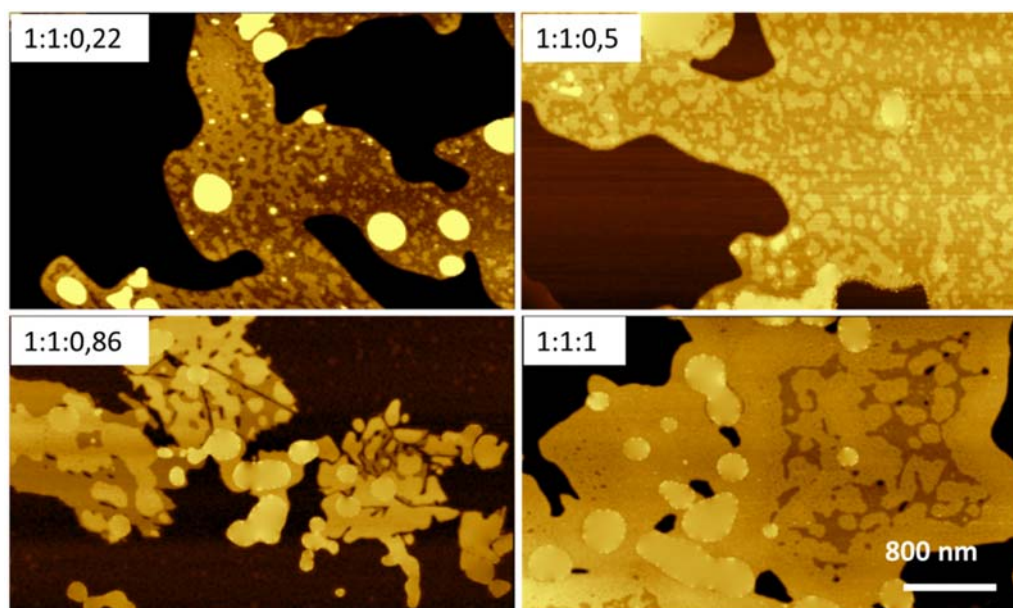


Figura 11. Imágenes de las cuatro mezclas DPPC:Col:GSL estudiadas en este trabajo para las composiciones indicadas.

En la tabla 3 se recogen los parámetros más relevantes acerca de su topografía: altura de los dominios, rugosidad, la profundidad del rascado y el porcentaje de recubrimiento de los dominios internos y su altura. Se puede ver que la altura de las regiones cubiertas es similar en casi todas las muestras pero que las alturas de los dominios internos varían de unas composiciones a otras y se hacen mayores cuanto mayor es la ratio de GSL. Ocurre lo mismo con las regiones de fondo donde la profundidad de la misma, así como el porcentaje de recubrimiento de los dominios internos, aumentan al aumentar la cantidad de GSL depositada. Estas tendencias se ilustran en la Figura 12 que muestra la correlación entre la altura de los dominios internos y el porcentaje de recubrimiento de estos en función de la proporción de GLS. Es bien sabido que las células contienen balsas lipídicas que son microdominios de pequeño tamaño (10-200 nm), heterogéneos y enriquecidos en esteroides y esfingolípidos. Concluimos que los dominios observados en las membranas celulares simuladas en este trabajo deben contener GSL ya que hay una relación directa entre la cantidad de GSL de la muestra, el porcentaje de recubrimiento y la altura de los dominios internos de la muestra (Figura 12) y que estos dominios se corresponden con las balsas lipídicas encontradas en las células que intervienen en gran número de funciones celulares (y cada vez se conocen más), como pueden ser la

respuesta a la invasión de patógenos, la homeostasis del colesterol, angiogénesis, transducción de señales, etc.

Tabla 3. Comparación de los diferentes parámetros analizados mediante AFM.

Muestra	h(dominio) [nm]	h(dom.int.) [nm]	Θ(dom.int.) [%]	h(rascado) [nm]	Rugosidad RMS(fondo) [nm]
DPPC:Col:GSL					
1:1:0,22	4	0,6	42	0,5	0,15
1:1:0,5	4	0,8	49	0,5	0,30
1:1:0,86	4	1,1	69	0,8	0,50
1:1:1	5	1,1	79	1,5	0,75
0:0:1	1	4	-	1,2	-

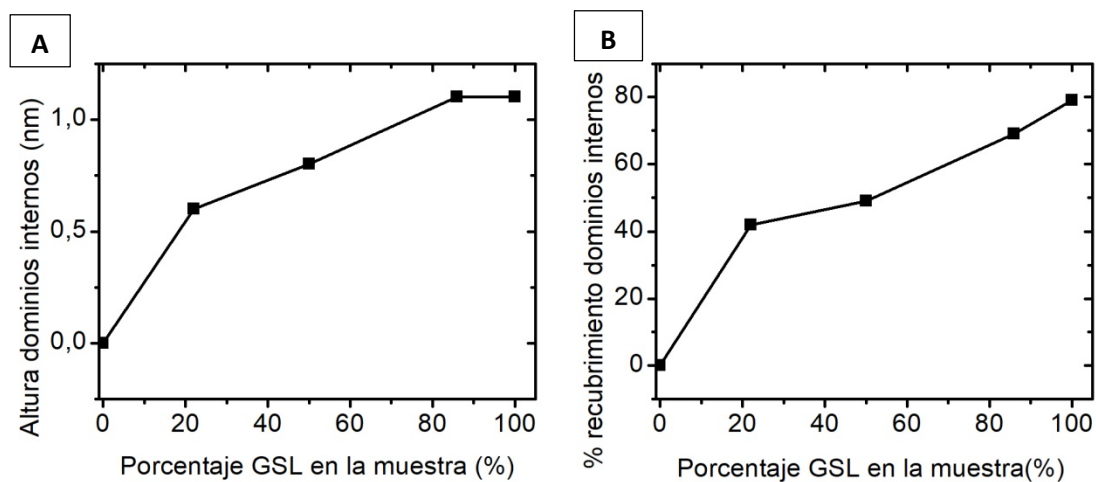


Figura 12. A) Altura de los dominios internos en función de la proporción de GSL de la muestra. B) Porcentaje de recubrimiento de los dominios internos en función de la proporción de GSL.

- 4.4. Caracterización de nanopartículas

En primer lugar, las nanopartículas magnéticas se han depositado en una muestra de DPPC:Col:GSL 1:1:1. Para ello, se incubó esta muestra durante 5 horas en una disolución de nanopartículas magnéticas (MNPs). Posteriormente se dejó secar y se observó la muestra en el AFM concluyendo (Figura 13) que las MNPs se han depositado sobre la muestra, sobre todo en las regiones cubiertas y en mucha menor medida en el fondo, sugiriendo una cierta especificidad en la deposición. El perfil de alturas de esta muestra indica la presencia de MNPs con alturas entre 6 y 9 nm. La altura de las MNPs es significativamente menor que su diámetro pues se sabe bien que por lo general las nanopartículas se achatan al depositarlas sobre una superficie sólida.²²

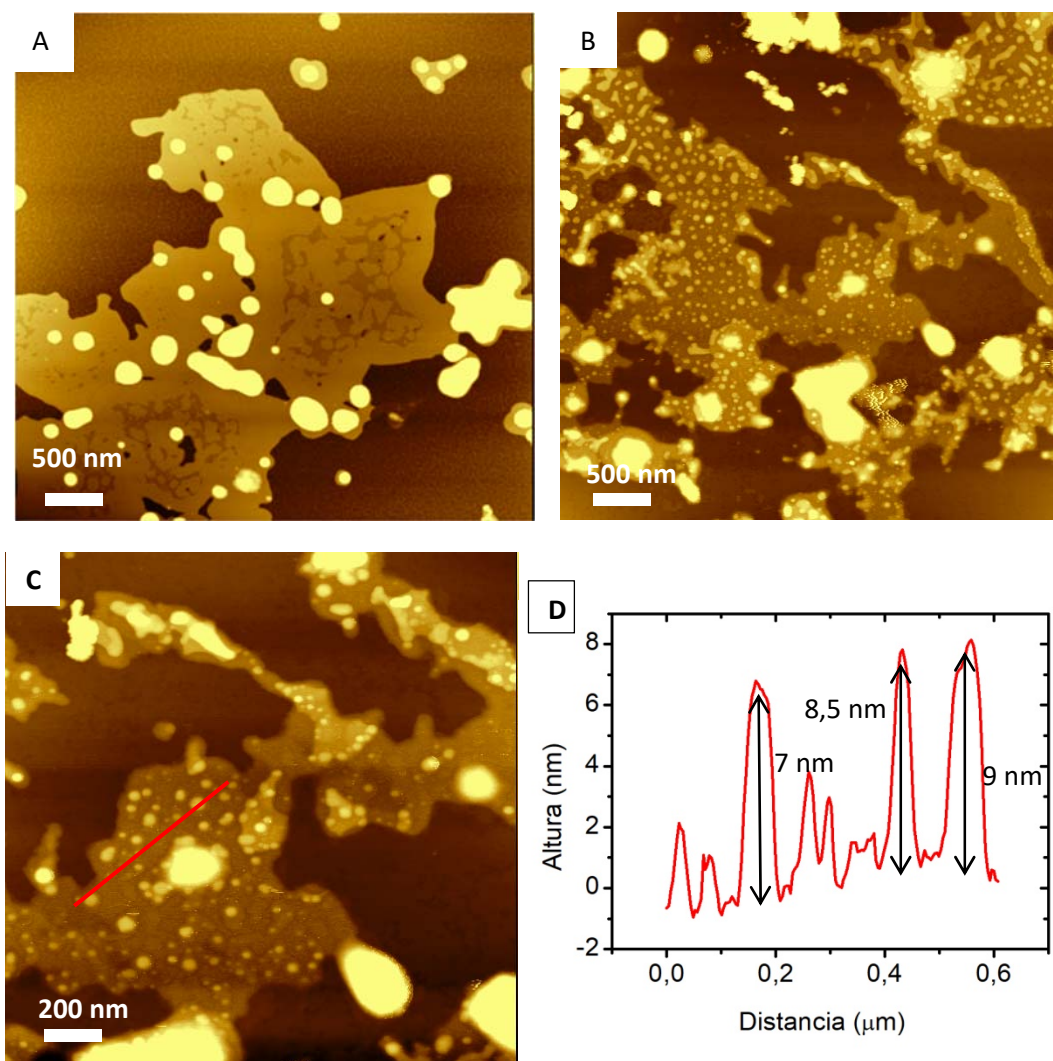


Figura 13. A) Imagen correspondiente a una muestra 1:1:1 son nanopartículas depositadas. B) y C) Imágenes correspondiente a la muestra 1:1:1 con nanopartículas depositadas. C) Perfil de alturas para la región indicada en la imagen B.

5. Conclusiones y trabajo futuro

Las conclusiones de este trabajo pueden quedar resumidas de la siguiente manera:

- Las películas LB de DPPC:Col:GSL muestran regiones y dominios internos dentro de estas existiendo una clara relación entre la proporción de glicosfingolípido en la muestra y la altura de los dominios y su porcentaje de recubrimiento, lo que indica que estos dominios están integrados, al menos en un porcentaje significativo, por el glicosfingolípido. Posiblemente estos dominios se corresponden con las balsas lipídicas de las células.
- Al introducir las películas LB DPPC:Col:GSL 1:1:0,22 en agua se observa una variación en las alturas de los dominios, indicativa de una reorganización de las moléculas. Este fenómeno había sido ya observado en monocapas de DPPC:Col 1:1 e indica que estas películas son susceptibles de reorientarse en función del entorno en el que se encuentran.
- En comparación con las monocapas DPPC:Col, la introducción del glicosfingolípido en la mezcla, se traduce en películas menos homogéneas con la presencia de una película muy delgada de fondo, regiones de mayor altura, propias de una bicapa, y dominios internos dentro de estas, cuya composición apunta a una presencia significativa del GLS.
- Se han depositado MNPs magnéticas sobre las películas de DPPC:Col:GLS, con una presencia más significativa de éstas en las regiones ricas en el GLS (regiones de mayor altura y dominios internos dentro de éstas), lo que apunta a cierta especificidad entre el glicosfingolípido y las NPs.
- Como resultado de este trabajo, quedan abiertas muchas preguntas que habrán de responderse en investigaciones ulteriores a este TFG, y que incluyen estudios más profundos sobre las interacciones entre los tres componentes de las membranas, orientación específica de cada uno de ellos en las tres zonas observadas (fondo, regiones con bicapas y dominios internos). De particular transcendencia serán los estudios de hipertermia magnética para analizar la respuesta de la membrana ante el calentamiento local inducido por ésta.

- Finalmente, considero que el trabajo realizado en esta investigación me ha permitido afianzar los conocimientos teóricos y prácticos adquiridos a lo largo de los 4 años de Grado y ampliarlas hacia un campo concreto de investigación, desconocido para mí antes de comenzar el TFG. Además, he adquirido un grado importante de autonomía en el laboratorio y el TFG me ha proporcionado una visión general de lo que supone un trabajo de investigación.

6. Bibliografía

1. Sen, S.; Banerjee, A.; Acharjee, A. Nanotechnology: Shaping the world atom by atom. *International Journal of Modern Engineering Research* **2013**, *3*, 2219-2225.
2. Hulla, J.; Sahu, S.; Hayes, A. Nanotechnology: History and future. *Human & Experimental Toxicology* **2015**, *34*, 1318-1321; DOI: 10.1177/0960327115603588.
3. Surendiran, A.; Sandhiya, S.; Pradhan, S. C.; Adithan, C. Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian Journal of Medicine Research* **2009**, *130*, 689-701.
4. Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **1972**, *175*, 720-731; DOI: 10.1126/science.175.4023.720.
5. Krause, M. R.; Regen, S. L. The structural role of cholesterol in cell membranes: from condensed bilayers to lipid rafts. *Accounts of Chemical Research* **2014**, *47*, 3512-3521; DOI: 10.1021/ar500260t.
6. Norman, J. J.; Desai, T. A. Methods for Fabrication of Nanoscale Topography for Tissue Engineering Scaffolds. *Annals of Biomedical Engineering* **2006**, *34*, 89-101; DOI: 10.1007/s10439-005-9005-4.
7. Groot, R. D.; Rabone, K. L. Mesoscopic simulation of cell membrane damage, morphology change and rupture by nonionic surfactants. *Biophysical Journal* **2001**, *81*, 725-736; DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75737-2.
8. Christensen, S. M.; Stamou, D. Surface-based lipid vesicle reactor systems: fabrication and applications. *Soft Matter* **2007**, *3*, 828-836; DOI: 10.1039/B702849K.
9. McQuaw, C.; Goach Sostarecz, A.; Zheng, L.; G. Ewing, A.; Winograd, N. Lateral heterogeneity of dipalmitoylphosphatidylethanolamine-cholesterol Langmuir-Blodgett films investigated with imaging time-of-flight secondary ion mass spectrometry and atomic force microscopy. *Langmuir* **2005**, *21*, 807-813; DOI: 10.1021/la0479455.
10. Anonymous M-ERA.NET Call 2016: Funded projects. <https://m-era.net/joint-calls/joint-call-2016/list-of-funded-projects-2016.pdf> (última fecha consultada 06/06, 2019).
11. Ruiz-Rincon, S.; Gonzalez-Orive, A.; de la Fuente, Jesús M.; Cea, P. Reversible Monolayer-Bilayer Transition in Supported Phospholipid LB Films under the Presence of Water: Morphological and Nanomechanical Behavior. *Langmuir* **2017**, *33*, 7538-7547; DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b01268.
12. Moros, M.; Pelaz, B.; Lopez-Larrubia, P.; L. Gracia-Martin, M.; Grazua, V.; M. de la Fuente; Jesús Engineering biofunctional magnetic nanoparticles for biotechnological applications. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1746-1755; DOI: 10.1039/CONR00104J.

13. Sun, S.; Zeng, H.; B. Robinson, D.; Raoux, S.; M. Rice, P.; X. Wang, S.; Li, G. Monodisperse MFe₂O₄ (M) Fe, Co, Mn) Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 273-279; DOI: 10.1021/ja0380852.
14. Cea, P.; Ballesteros, L. M.; Martín, S. Nanofabrication techniques of highly organized monolayers sandwiched between two electrodes for molecular electronics. *Nanofabrication* **2014**, *1*, 96-117; DOI: 10.2478/nanofab-2014-0010.
15. Kim, K.; Kim, C.; Byun, Y. Preparation of a dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol Langmuir-Blodgett monolayer that suppresses protein adsorption. *Langmuir* **2001**, *17*, 5066-5070; DOI: 10.1021/la0102096.
16. Langmuir, I.; Schaefer, V. J. Activities of Urease and Pepsin Monolayers. *Journal of the American Chemical Society* **1938**, *60*, 1351-1360; DOI: 10.1021/ja01273a023.
17. Liu, J.; Conboy, J. C. Structure of a Gel Phase Lipid Bilayer Prepared by the Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaefer Method Characterized by Sum-Frequency Vibrational Spectroscopy. *Langmuir* **2005**, *21*, 9091-9097; DOI: 10.1021/la051500e.
18. Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* **1986**, *56*, 930-933.
19. García, R.; Pérez, R. Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Reports* **2002**, *47*, 197-301.
20. Ruiz Rincon, S. Formation and characterization of model cell membranes and their interaction with magnetic nanoparticles. Trabajo de Fin de Master. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 2015.
21. Martín Solans, S. Estudio de moléculas con potenciales aplicaciones en la obtención de electrodos modificados y óptica no lineal utilizando la técnica LB. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 2005.
22. Martín, S.; Ballesteros, L. M.; González-Orive, A.; Oliva, H.; Marqués-González, S.; Lorenzoni, M.; Nichols, R.; Pérez-Murano, F.; Low, P. J.; Cea, P. Towards a metallic top contact electrode in molecular electronic devices exhibiting a large surface coverage by photoreduction of silver cations. *Journal of Materials Chemistry C*. **2016**, *4*, 9036-9043; DOI: 10.1039/C6TC03319A.